Linea Guida

Progettazione, installazione, collaudo e gestione di sale criobiologiche

***EDIZIONE* 2 - 15 settembre 2015**

ASSOGASTECNICI
Associazione Nazionale Imprese gas tecnici, speciali e medicinali

20149 Milano, Via Giovanni da Procida 11
Tel. +39 02 34565.242
Fax +39 02 34565.458
E-mail: agt@federchimica.it
http://assogastecnici.federchimica.it
Codice fiscale 80036210153

Il presente documento è stato approvato dalla Commissione Direttiva del Gruppo Gas Medicinali e Servizi per il Settore Ospedaliero proposto e realizzato dal Comitato Tecnico-Regolatorio.

INDICE

1. Introduzione 4
2. Scopo 5
3. Definizioni 5
4. Progettazione della sala criobiologica 6
 4.1 Criteri generali 6
 4.2 Serbatoio criogenico fisso 7
 4.3 Linea criogenica 9
5. Caratteristiche delle apparecchiature connesse alla linea criogenica 12
 5.1 Contenitori criobiologici 12
 5.2 Contenitori criogenici mobili pressurizzati 13
6. Caratteristiche delle apparecchiature non connesse alla linea criogenica 13
 6.1 Contenitori criogenici mobili a pressione atmosferica 13
 6.2 Contenitori criobiologici senza centralina per la gestione automatica del riempimento. 13
 6.3 Congelatori a discesa programmata della temperatura 13
7. Sistemi di supervisione e di automazione della sala criobiologica 13
8. Requisiti strutturali delle sale criobiologiche 14
9. Requisiti impiantistici delle sale criobiologiche 15
 9.1 Monitoraggio atmosferico e ventilazione 15
 9.2 Controllo degli accessi 16
 9.3 Impianto elettrico e impianto di illuminazione 17
 9.4 Segnaletica di sicurezza 17
 9.5 Impianto di rilevazione fumi 17
10. Installazione e collaudo 18
 10.1 Installazione della linea criogenica 18
 10.2 Installazione del sistema di supervisione e di automazione 18
 10.3 Collaudo 18
11. Documentazione, consegna e messa in servizio 19
12. Attività a cura del committente 19
13. Riferimenti Legislativi e Normativi 20

1. Introduzione

La crioconservazione a bassissima temperatura per mezzo di azoto liquido, è una pratica ormai da lungo tempo consolidata nella ricerca scientifica, medica, ambientale e nelle strutture sanitarie o in strutture dedicate per la conservazione di sangue, organi, parti di organo, tessuti e cellule di origine umana. La conservazione per lungo tempo di preziosi campioni medici e biologici viene assicurata mantenendo gli stessi in azoto in fase liquida o gassosa, ad una temperatura inferiore a -140 °C.

L'efficacia del processo richiede che i campioni stessi siano conservati senza interruzione a tale temperatura e dipende dalle modalità utilizzate per il mantenimento, nei contenitori dedicati alla conservazione, di un adeguato livello di azoto liquido. Nonostante i contenitori dedicati alla conservazione siano provvisti di un efficiente isolamento termico, anche un modesto aumento della temperatura interna può compromettere la corretta conservazione dei campioni e impedirne il successivo utilizzo dei campioni.
La conservazione può avvenire in uno o più contenitori che vengono riforniti manualmente o in automatico con azoto liquido quando necessario.

Una corretta gestione dei rischi, in collaborazione con il fornitore del gas, deve individuare le situazioni potenzialmente pericolose che possono compromettere la corretta conservazione dei campioni.
Particolare attenzione deve essere posta ai seguenti aspetti:

- il costante mantenimento, in ciascun contenitore criobiologico, di un livello minimo di azoto liquido che non deve essere assolutamente superato;
- adeguate registrazioni devono poter sempre fornire evidenza che la temperatura necessaria sia stata mantenuta con continuità.

Una gestione essenzialmente manuale non può soddisfare i requisiti di una corretta gestione dei rischi.

Una soluzione già da tempo introdotta e utilizzata nelle strutture dedicate è costituita da un serbatoio criogenico fisso (nel quale l'azoto liquido viene travasato dalla cisterna del fornitore del gas e ivi stoccato), che alimenta tramite un sistema automatizzato, più contenitori criobiologici nei quali i campioni vengono conservati assicurando con continuità il corretto livello di azoto in ciascuno di essi. Ogni contenitore criobiologico è provvisto di un sistema di rilevamento del livello e della temperatura e pilota automaticamente il rifornimento dal serbatoio criogenico fisso al quale è collegato da una linea criogenica sotto vuoto.
Questo sistema è pertanto molto complesso e richiede un'adeguata progettazione sia per quanto riguarda il sistema stesso ed i suoi componenti che per gli ambienti nei quali è prevista la sua installazione; il rispetto di tutti i requisiti derivanti da leggi e da norme tecniche applicabili è una condizione necessaria. La gestione del sistema implica la continua disponibilità di personale del committente adeguatamente formato e un continuo monitoraggio dei parametri rilevati. Inoltre una costante collaborazione con il fornitore del gas è necessaria per assicurare che un adeguato stoccaggio minimo sia sempre disponibile nel serbatoio principale e che vengano pertanto concordate sia le modalità per il rifornimento periodico che le modalità da attivare in caso di emergenze.

2. Scopo

Lo scopo della presente Linea Guida è quello di fornire elementi minimi per la progettazione, l'installazione, i collaudi e la gestione di una sala criobiologia dotata di sistemi automatici di riempimento dei relativi contenitori criobiologici utilizzati per la conservazione di campioni biologici a temperature criogeniche, utilizzando azoto liquido come refrigerante.
Il presente documento non si applica alla gestione della tracciabilità dei campioni biologici in quanto di competenza esclusiva dei gestori della sala criobiologia.

3. Definizioni

Sala criobiologica: Una sala criobiologica è una struttura progettata e realizzata per la conservazione alle basse temperature, generalmente mediante l'utilizzo di fluidi criogenici, di materiale biologico destinato ad usi clinici, diagnostici, terapeutici, per studi sulla biodiversità e per finalità di ricerca biomedica.

Contenitore criobiologico: contenitore a controllo manuale o automatico non pressurizzato, in cui i campioni biologici sono mantenuti a temperature criogeniche.

Linea criogenica: tubazione coibentata o isolata sotto vuoto che collega il serbatoio criogenico fisso al contenitore criobiologico per il trasferimento dell'azoto liquido, comprendente tutte le valvole, i raccordi e gli strumenti di controllo necessari.

Rilevatori di sotto-ossigenazione: dispositivi per il monitoraggio in continuo del tenore di ossigeno atmosferico all'interno della sala criobiologica.

Serbatoio criogenico fisso: dispositivo di stoccaggio dell'azoto liquido in grado di alimentare in continuo la linea criogenica.

Contenitore criogenico mobile pressurizzato: dispositivo di stoccaggio mobile dell'azoto liquido che può venire utilizzato come riserva (back-up) per alimentare la linea criogenica.

Valvola di sicurezza: dispositivo automatico destinato a mantenere la pressione al di sotto un valore stabilito.

Sistemi di supervisione e automazione: insiemi che assicurano, mediante il monitoraggio e l'azionamento, la gestione dei dispositivi che compongono la sala criobiologica.

Committente: struttura ospedaliera, laboratorio di ricerca, struttura di stoccaggio campioni o officina farmaceutica operante in regime GMP.

4. Progettazione della sala criobiologica
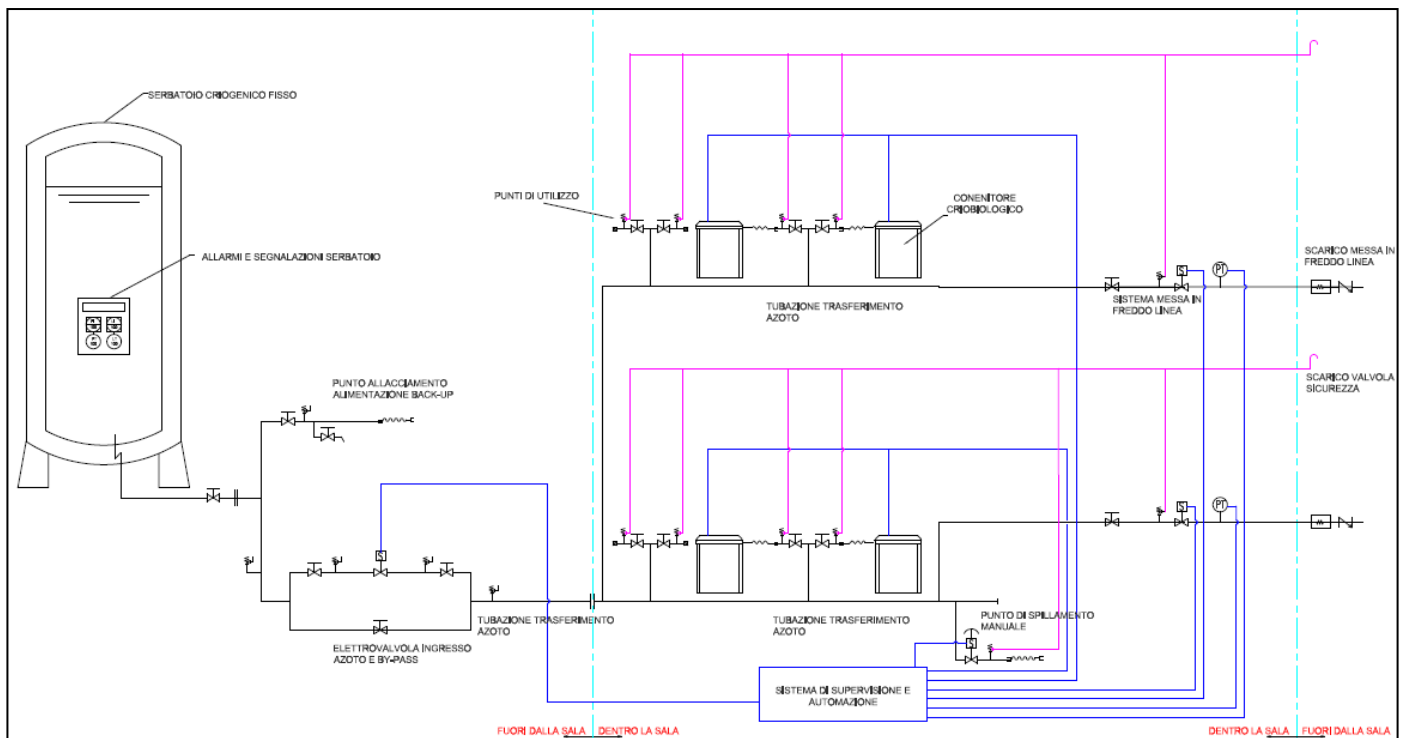
Figura 1 – Esempio di P&ID di una sala criobiologica

4.1 Criteri generali

Gli elementi d'ingresso per la progettazione della sala criobiologia sono indicati dalle necessità del cliente, come per esempio la capacità, il numero e la tipologia di contenitori criobiologici richiesti (comprensivo dei consumi), gli spazi messi a disposizione e eventuali altre tipologie di apparecchiature richieste.

La progettazione della sala criobiologia deve essere effettuata da un soggetto adeguatamente qualificato sulla base delle norme tecniche di riferimento e delle modalità di funzionamento in sicurezza delle apparecchiature e dei contenitori criobiologici.

Il progettista deve definire, considerando i dati di ingresso, :

- le dimensioni del serbatoio criogenico fisso;
- la necessità di fonti di riserva (back-up) di azoto liquido;
- le caratteristiche e il layout della linea criogenica di alimentazione dell'azoto liquido;
- la disposizione dei contenitori criobiologici;
- le caratteristiche e le tipologie dei sistemi di supervisione e di automazione.

Nella definizione del progetto il progettista e il responsabile del committente devono anche considerare la possibilità che, nel tempo, nuovi contenitori criobiologici vengano collegati alla linea criogenica per essere da essa automaticamente riforniti.

Tutti i componenti della sala criobiologia selezionati devono soddisfare i requisiti normativi e legislativi.

4.2 Serbatoio criogenico fisso

Il serbatoio criogenico fisso deve essere dotato di valvole di sicurezza tarate al massimo a 4 bar e dei sistemi di funzionamento e sicurezza previsti dalle norme di riferimento. La capacità del serbatoio criogenico fisso deve essere calcolata sulla base dei consumi previsti e della periodicità dei rifornimenti con l'obiettivo di assicurare la continuità di erogazione di azoto liquido.

Sulla base dell'esperienza, risulta che i consumi delle sale criobiologiche siano molto variabili. Per tale ragione la capacità del serbatoio criogenico fisso deve essere tale da garantire:

- almeno 10 (dieci) giorni di autonomia, considerando il consumo medio giornaliero del mese di massimo consumo;
- almeno 15 (quindici) giorni di autonomia, considerando il consumo medio giornaliero ricavato dal consumo annuale.

Per autonomia si intende il funzionamento regolare della sala criobiologica senza alcun rifornimento del serbatoio criogenico fisso.

> I criteri per l'installazione e l'ubicazione del serbatoio criogenico fisso sono definiti nella Linea Guida di Assogastecnici:
>
> *"Impianti di distribuzione dei gas medicinali – Dimensionamento delle centrali di alimentazione"*

L'installazione del serbatoio criogenico fisso deve tenere conto delle norme vigenti in merito di antisismica, distanze di sicurezza e impianto di messa a terra.

È pratica comune montare un dispositivo per mantenere il serbatoio criogenico fisso a una pressione costante ed inferiore al più basso valore di taratura delle valvole di sicurezza.

4.2.1 Allarmi e segnalazioni del serbatoio criogenico fisso

Il serbatoio criogenico fisso deve essere dotato di sistemi per la misurazione della pressione e del livello.

Tali informazioni devono essere rese disponibili al committente, con opportuno dispositivo di segnalazione collocato in zona costantemente presidiata e monitorata (7 giorni/7, 24h/24), oltre ad essere trasmesse al fornitore di azoto liquido tramite telerilevamento.

Non essendo possibile l'installazione delle tre fonti di alimentazione (primaria, secondaria e riserva) così come previsto ed attuato per le centrali gas medicinali, è necessario implementare, per il telerilevamento destinato al fornitore di azoto, un sistema che preveda le seguenti soglie di allarme:

- Livello basso ➔ segnala una situazione anomala che richiede necessariamente una verifica.
- Livello minimo ➔ segnala un pericolo imminente di svuotamento del serbatoio.
- Bassa pressione ➔ segnala una situazione anomala che richiede necessariamente una verifica.
- Alta pressione ➔ segnala una situazione anomala che richiede necessariamente una verifica.

E' necessario che il fornitore del gas definisca nelle proprie procedure operative la soglia di rifornimento, in base ai dati di progetto e successivamente di consumo rilevati dal sistema e aggiornati periodicamente, al raggiungimento della quale deve essere attivato l'iter di consegna del gas liquido.

Tale valore deve essere necessariamente superiore alla soglia di attivazione di allarme "Livello basso".

Si hanno complessivamente tre livelli: soglia di rifornimento, livello basso e livello minimo.

La soglia di rifornimento deve essere tale da garantire un'autonomia residua di almeno 5 (cinque) giorni.
In questo modo il serbatoio è dimensionato in modo da essere idealmente suddivisibile in tre livelli virtuali equiparabili a volumi per uso ordinario, di riserva e di emergenza.
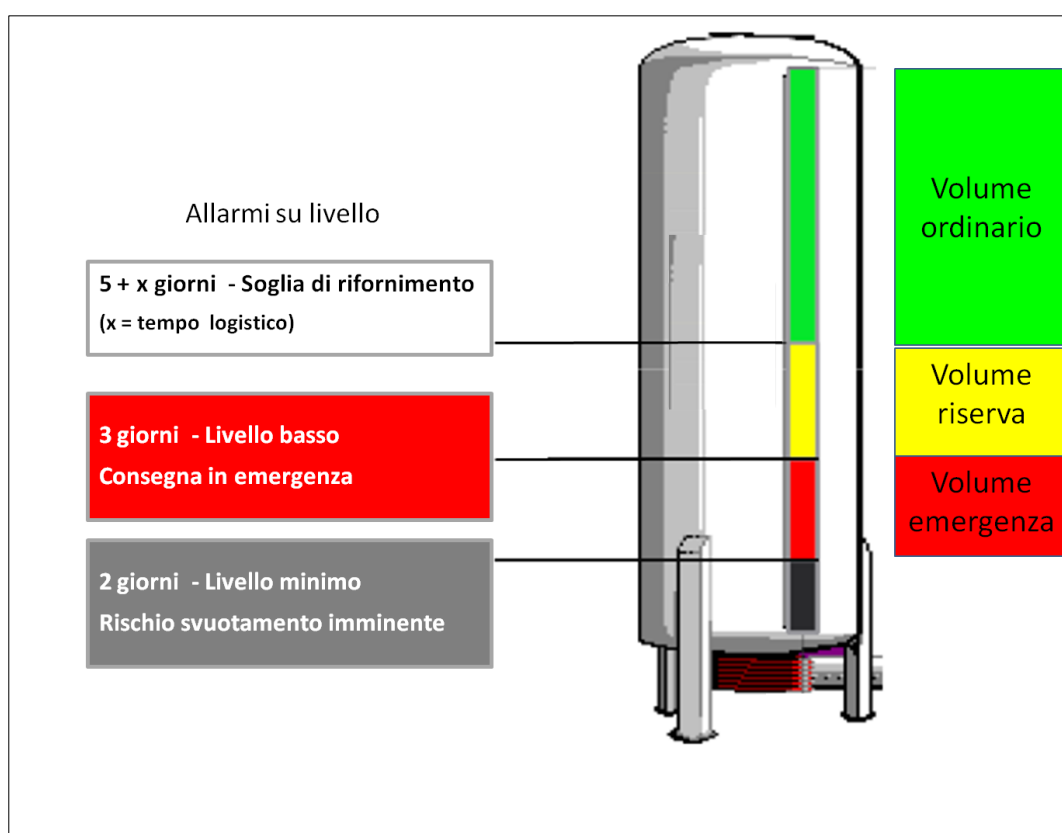
Figura 2 – Soglia rifornimento e allarmi livello

Per il dispositivo di segnalazione a servizio del committente, devono essere rese disponibili le seguenti soglie di allarme:

- Livello basso ➔ segnala una situazione anomala di cui il cliente deve essere informato.
- Livello minimo ➔ segnala un pericolo imminente di svuotamento del serbatoio per il quale, ai fini della corretta conservazione dei campioni, occorre adottare delle misure di prevenzione.
- Bassa pressione ➔ segnala un pericolo per il quale, ai fini della corretta conservazione dei campioni, occorre adottare delle misure di prevenzione.
- Alta pressione ➔ segnala una situazione anomala di cui il cliente deve essere informato.

In caso di sostituzione del serbatoio criogenico fisso e/o del solo sistema di telerilevamento, devono essere sempre disponibili e verificate le segnalazioni di allarme sopra indicate.

4.2.2 Alimentazione di back up

Deve essere sempre prevista una connessione per consentire l’alimentazione di azoto in caso di indisponibilità del serbatoio criogenico fisso.
La sorgente di alimentazione deve poter erogare azoto anche in caso di disservizio parziale o totale della linea criogenica per far ciò, in accordo col committente, si deciderà se installare una sorgente di back up pressurizzata o utilizzare un contenitore criogenico trasportabile per permettere di spillare liquido direttamente dal serbatoio criogenico fisso ed effettuare il riempimento manuale dei contenitori criobiologici.

4.3 Linea criogenica

La presente linea guida considera la linea criogenica con sistema di messa a freddo pilotato (non vengono, invece, trattate le configurazioni che impiegano separatori di fase).
La linea criogenica è tipicamente composta da:

- una tubazione composta da una camicia esterna che consenta la messa (e il mantenimento) sotto vuoto o la coibentazione e dalla tubazione criogenica di trasferimento dell’azoto liquido;
- un’elettrovalvola di ingresso dell’azoto liquido alla tubazione di trasferimento dell’azoto, dotata di valvole manuali di by-pass e di relative valvole di sicurezza;
- punti di utilizzo con valvole manuali, elettrovalvole e valvole di sicurezza per l’alimentazione delle singole utenze;
- un gruppo di messa a freddo della tubazione criogenica di trasferimento, dotato di elettrovalvola, sonda di temperatura, eventuali valvole di by-pass e relative valvole di sicurezza.

Nel caso di linee criogeniche complesse a più rami, la componentistica indicata deve essere anche replicata su ogni tratto di linea criogenica.

Il dimensionamento della linea criogenica deve essere effettuato definendo il percorso, il numero di punti di utilizzo, la loro tipologia e la relativa contemporaneità di riempimento dei contenitori criobiologici al fine di garantire l’erogazione dell’azoto liquido all’utenza più distante.

I criteri per il dimensionamento devono essere necessariamente condivisi con il committente.

4.3.1 Tubazione di trasferimento dell’azoto liquido

La tubazione di trasferimento dell’azoto liquido deve essere coibentata o isolata sottovuoto.

Le tubazioni coibentate, a causa del loro alto coefficiente di trasmissione del calore rispetto a quelle isolate sottovuoto, possono essere utilizzate per brevi percorsi e/o per un numero di utenze limitato.

Le tubazioni isolate sottovuoto consistono di: una tubazione interna che trasporta l’azoto liquido, contenuta all’interno di una tubazione esterna di diametro adeguato a realizzare un’intercapedine in cui viene creato il vuoto, in modo da garantire l’erogazione dell’azoto in fase liquida a tutte le utenze.
E’ possibile prevedere la realizzazione di linee con giunzioni di tipo “Johnston” o con giunti saldati. Deve essere prevista la possibilità di ripristino del vuoto tramite appositi connettori.

In ogni caso le tubazioni devono essere realizzate in acciaio inox AISI 304 o AISI 316.
In considerazione delle variazioni di temperatura della linea, è necessario prevedere idonei sistemi di compensazione delle dilatazioni.
La tubazione deve riportare un’etichetta con indicato “Azoto Liquido” ed il senso del flusso.
Le tubazioni devono essere collegate alla rete di messa a terra.
Il percorso della tubazione deve essere ispezionabile ove ciò non comporti potenziali pericoli. Non sono ammesse tubazioni sotto traccia.

4.3.2 Elettrovalvola di ingresso dell’azoto liquido alla linea criogenica

L’elettrovalvola di ingresso dell’azoto liquido alla linea criogenica deve prevedere un sistema automatico in grado di interromperne l’erogazione in caso di sotto-ossigenazione grave all’interno dei locali della sala criobiologica (qualora la percentuale di ossigeno risulti inferiore al 18%). Detta elettrovalvola può essere normalmente comandata in posizione “aperta” o in posizione “chiusa”, in relazione a differenti modalità operative.

L’elettrovalvola di ingresso dell’azoto liquido deve avere le seguenti caratteristiche:

- essere ubicata in un luogo ben ventilato e accessibile;
- essere collocata il più vicino possibile al serbatoio criogenico fisso;
- essere chiaramente etichettata per consentire l'identificazione da parte dei servizi di emergenza e di altro personale che potrebbe non avere familiarità con le specifiche caratteristiche del sito;
- poter essere manualmente bypassata tramite valvole ad azionamento manuale (per fornire un’ulteriore possibilità di sezionamento in circostanze di emergenza o di manutenzione);
- operare in modalità Failure-Closed (FC) in caso di mancanza di energia elettrica o di perdita del segnale di azionamento.

Tutti i componenti devono essere chiaramente identificati ed etichettati.

4.3.3 Punti di utilizzo

Il punto di utilizzo è il dispositivo di connessione tra la linea di trasferimento dell'azoto liquido e l'utenza finale.
Il tipico punto di utilizzo deve essere dotato di una valvola di intercettazione manuale o di un'elettrovalvola, di una valvola di sicurezza e di un flessibile di collegamento al contenitore criobiologico.

Nel caso di un punto di utilizzo per lo spillamento manuale dell'azoto liquido all'interno della sala criobiologica, è necessario prevedere un sistema di sicurezza che interrompa l'erogazione di azoto liquido in caso di malore dell'operatore.

Nel caso di un punto di utilizzo dedicato al riempimento di contenitori criogenici mobili pressurizzati all'interno della sala criobiologica, devono essere adottate tutte le soluzioni impiantistiche che consentano l'operatività in sicurezza.

4.3.4 Messa a freddo delle linee criogeniche

Un sistema di messa a freddo deve essere previsto per raffreddare la linea di distribuzione prima del rabbocco dei contenitori criobiologici. Il sistema assicura che ogni contenitore criobiologico venga rifornito solamente con azoto in fase liquida piuttosto che con una miscela di liquido e di gas.
Il sistema è provvisto di un'elettrovalvola di messa a freddo, di una termocoppia per la misurazione della temperatura del gas in linea, di valvole manuali di by-pass, di valvole di sicurezza e di eventuale manometro.
Il dispositivo è attivato dalla richiesta di azoto da parte di un contenitore criobiologico. L'elettrovalvola di messa a freddo viene aperta e l'azoto liquido scorre nella tubazione raffreddandola.
Quando la termocoppia di messa in freddo rileva una temperatura pari a circa -150 °C, l'elettrovalvola di messa a freddo viene chiusa e l'azoto in fase liquida può rifornire i contenitori criobiologici.
L'azoto gassoso prodotto durante la messa a freddo deve essere evacuato verso un ambiente esterno ben ventilato, protetto e lontano da luoghi di passaggio e di permanenza di persone.
Al fine di prevenire la formazione di condensa, può essere necessario prevedere la coibentazione della tubazione di sfiato del gas.

4.3.5 Valvole di sicurezza

Le valvole di sicurezza devono essere montate in tutti i casi nei quali l'espansione termica del liquido o del gas contenuto può generare una pressione superiore alla pressione di progettazione dei singoli componenti.
Per esempio, i tratti di tubazione potenzialmente soggetti ad intercettazione fra due valvole manuali o due elettrovalvole devono essere sempre dotati di valvole di sicurezza.

Tali valvole di sicurezza devono essere dimensionate in modo da mantenere la pressione all'interno dei componenti al di sotto del valore di progettazione.

Il convogliamento all'esterno dei punti di scarico di tutte le valvole di sicurezza deve essere in funzione dei risultati di una specifica analisi dei rischi.
I punti di scarico devono essere posizionati lontano:

- dagli ambienti di lavoro;
- da luoghi di passaggio o di stazionamento del personale;
- da scarichi pluviali;
- da ingressi di edifici, da entrate di luoghi ristretti e confinati, da punti di ripresa di impianti di trattamento aria, ecc.

Deve essere effettuata una valutazione per garantire che i convogliamenti esterni non compromettano il funzionamento della valvola di sicurezza, ad esempio causando una perdita di pressione eccessiva. Il punto di scarico deve essere progettato in modo da evitare blocchi accidentali o intenzionali o l'accumulo di acqua piovana, di altri detriti o l’ingresso di insetti e deve essere posizionato come precedentemente indicato.

Il valore di taratura delle valvole di sicurezza deve essere scelto in funzione della pressione massima di progettazione delle apparecchiature connesse all’impianto, garantendo la “cascata” delle pressioni di apertura delle valvole di sicurezza, elencate in ordine decrescente dalla più alta alla più bassa:

1. Pressione di apertura delle valvole di sicurezza dei circuiti dei contenitori criobiologici (situati all’interno della sala criobiologia);
2. Pressione di apertura delle valvole di sicurezza della linea criogenica;
3. Pressione di apertura della valvole di sicurezza del by-pass della valvola di ingresso dell’azoto liquido (situata in prossimità del serbatoio criogenico fisso).

Tale modalità di taratura rende meno probabile l’apertura delle valvole di sicurezza situate internamente alla sala criobiologica.

5. Caratteristiche delle apparecchiature connesse alla linea criogenica

5.1 Contenitori criobiologici

I contenitori criobiologici devono essere tali da garantire un efficace stoccaggio di materiale biologico in azoto in fase liquida o in fase gassosa. La camera di stoccaggio può essere costruita in acciaio o in alluminio.

I contenitori criobiologici, qualora destinati ad applicazioni previste dalla Direttiva 93/42 CEE, sono considerati dispositivi medici.

5.1.1 Caratteristiche dei contenitori criobiologici

I contenitori criobiologici destinati ad essere collegati ad una linea criogenica devono essere equipaggiati con una centralina di gestione automatica del riempimento.

La centralina di gestione e controllo deve essere in grado di:

- misurare il livello di azoto liquido all’interno del contenitore tramite sonde o sensori;
- misurare la temperatura tramite una o più sonde poste all’interno del contenitore;
- gestire il riempimento di azoto del contenitore;
- segnalare lo stato di funzionamento e le eventuali anomalie. Tali parametri e segnali devono essere collegati al sistema di supervisione e automazione.

5.2 Contenitori criogenici mobili pressurizzati

I contenitori criogenici mobili pressurizzati, sono costruiti esclusivamente per lo stoccaggio, il trasporto e lo spillamento manuale di azoto liquido.
Il contenitore criogenico mobile pressurizzato può anche essere riempito in maniera automatica tramite la linea di distribuzione azoto liquido.

I contenitori criogenici mobili pressurizzati sono considerati attrezzature a pressione trasportabili secondo la Direttiva TPED.

6. Caratteristiche delle apparecchiature non connesse alla linea criogenica

All'interno della sala criobiologica, a seconda del tipo di impiego, possono anche essere utilizzate le seguenti apparecchiature:

6.1 Contenitori criogenici mobili a pressione atmosferica

I contenitori criogenici mobili a pressione atmosferica sono costruiti per lo stoccaggio, il trasporto e lo spillamento manuale di azoto liquido e non sono destinati a conservare campioni biologici.

6.2 Contenitori criobiologici senza centralina per la gestione automatica del riempimento.

I contenitori criobiologici senza centralina di gestione automatica del riempimento sono destinati alla conservazione a breve termine di campioni biologici; possono avere sistemi di monitoraggio della temperatura o del livello, ma non possono essere collegati alla linea criogenica.

6.3 Congelatori a discesa programmata della temperatura

I congelatori a discesa programmata della temperatura sono dei dispositivi utilizzati per il congelamento controllato, da temperatura ambiente a temperatura di conservazione, di materiale biologico.
I congelatori sono alimentati da azoto liquido fornito non dalla linea criogenica ma da un contenitore criogenico pressurizzato, poiché il congelamento controllato dei campioni necessità di una pressione di alimentazione costante, che non può essere garantita dalla linea criogenica.

I congelatori a discesa programmata, qualora destinati ad applicazioni previste dalla Direttiva 93/42 CEE, sono considerati dispositivi medici.

7. Sistemi di supervisione e di automazione della sala criobiologica

Il sistema di supervisione e di automazione è un insieme di hardware e software in grado di assicurare la gestione dell'intera sala criobiologia al fine di garantire la conservazione dei campioni per un tempo indefinito e la sicurezza degli operatori.

Il sistema di supervisione e di automazione della sala criobiologica deve consentire:

- il riempimento automatizzato dei contenitori criobiologici con azoto liquido;
- il monitoraggio dei parametri provenienti dal serbatoio criogenico fisso;
- il monitoraggio continuo e la registrazione dei parametri funzionali atti a garantire la conservazione dei campioni stoccati (temperatura e livello);
- il monitoraggio dei parametri provenienti dai sensori del sistema di monitoraggio ambientale;
- la rilevazione delle condizioni di emergenza (sotto ossigenazione, uomo a terra, pressione del pulsante di emergenza);
- l'attivazione automatica delle interazioni di sicurezza quali la chiusura dell'elettrovalvola di ingresso dell'azoto liquido, l'azionamento della ventilazione ad alta velocità, l'azionamento degli allarmi acustico/luminosi;
- l'attivazione manuale, tramite i "pulsanti di emergenza", delle interazioni di sicurezza quali la chiusura dell'elettrovalvola di ingresso dell'azoto liquido, l'azionamento della ventilazione ad alta velocità, l'azionamento degli allarmi acustico/luminosi;
- la remotizzazione degli allarmi provenienti dal sistema di supervisione e automazione della sala criobiologica.

8. Requisiti strutturali delle sale criobiologiche

I locali destinati alla realizzazione di sale criobiologiche devono essere scelti tenendo conto dei seguenti criteri:

- Dimensioni: ciascun locale deve essere in grado di contenere le apparecchiature destinate ad esservi collocate. Non è consigliabile stoccare azoto liquido in locali con volume inferiore a 20 m^3 ed è consigliabile un'altezza dei locali non inferiore a 2,70 m.
  Devono essere lasciati spazi adeguati per consentire sempre un rapido accesso alla linea criogenica.
  E' inoltre necessario poter eseguire in sicurezza tutte le attività di manutenzione preventiva e correttiva raggiungendo agevolmente tutti i lati delle apparecchiature installate.
- Ubicazione: ciascun locale deve essere scelto in funzione della possibilità di garantire adeguate vie di fuga in caso di emergenza. Si consiglia di scegliere locali posti a livello stradale: i locali interrati presentano un rischio più elevato per quanto concerne i fenomeni di anossia, mentre locali a livelli superiori rispetto a quello stradale comportano normalmente maggiori consumi di azoto liquido. La sala criobiologica non deve essere utilizzata come passaggio per accedere ad altri locali.

Dal punto di vista strutturale valgono i seguenti criteri:

- Pavimentazione: i materiali scelti per la pavimentazione devono essere facilmente lavabili e devono garantire compatibilità con le basse temperature. Sono consigliati materiali quali ad esempio, il gres porcellanato o resina (per evitare la presenza di interstizi relativi alle fughe), mentre si sconsiglia l'utilizzo di linoleum, soggetto ad infragilimento e rottura in caso di contatto con l'azoto liquido.

- Rivestimenti: le pareti devono essere rivestite con materiale liscio, impermeabile e di facile pulizia fino ad un'altezza da terra di almeno a 1,80 m. Anche in questo caso, in funzione del layout della linea criogenica é utile prevedere materiali compatibili con le basse temperature.
- Visibilità: deve essere sempre possibile visualizzare dall'esterno i locali tramite ad esempio, porte di accesso con visive o altri sistemi che permettano la visione all'interno (ad esempio utilizzando pareti trasparenti).
- Porte di accesso: le porte sono normalmente non a tenuta anche se le Linee guida per la sala criobiologia di un Istituto dei tessuti emesse dal Centro Nazionale Trapianti (novembre 2014) prescrivono l'utilizzo di "dispositivi per impedire lo spandimento del gas in fase liquida o gassosa all'esterno attraverso la porta di accesso".
  Devono essere dotate di maniglioni antipanico e montate con verso di apertura sempre verso l'esterno per garantire la rapida evacuazione dei locali in caso di necessità. Le dimensioni delle porte dovranno tenere conto della grandezza delle apparecchiature che si prevede di installare all'interno della sala criobiologica.

9. Requisiti impiantistici delle sale criobiologiche

9.1 Monitoraggio atmosferico e ventilazione

L'azoto è un gas inodore, incolore e insapore; il rilascio di azoto in un ambiente, specialmente se scarsamente ventilato, può determinare una diminuzione della normale concentrazione dell'ossigeno atmosferico (circa 21%) e favorire la formazione di atmosfere sotto-ossigenate con conseguente rischio di asfissia per gli operatori.

Durante il normale funzionamento dei contenitori criobiologici, specialmente nella fase di riempimento, si potrebbe evidenziare la formazione di atmosfere sotto ossigenate ed è per questo motivo che tutti gli ambienti devono essere sempre monitorati da sistemi che prevengano situazioni di pericolo per l'operatore.

Tutti i possibili eventi di rilascio di azoto nell'ambiente, anche eccezionali, devono essere sempre presi in considerazione in fase di progettazione e sottoposti ad una valutazione del rischio sia da parte del progettista che dell'RSPP dell'utilizzatore finale.
Ogni ambiente deve essere valutato singolarmente, tenendo conto della destinazione d'uso, del suo volume e della ventilazione necessaria in funzione del suo volume.
Anche le aree non coperte che ospitano i serbatoi criogenici fissi devono essere incluse nella valutazione.

Per le sale criobiologiche o comunque per tutti gli ambienti di stoccaggio di azoto liquido, deve essere sempre previsto un sistema di ventilazione forzata a due velocità.

Il tasso di ventilazione non deve essere comunque inferiore a 10 ricambi/ora in condizioni di normali e a 25 ricambi/ora in condizioni di sotto ossigenazione inferiore al 19%.
Sulla base della valutazione dei rischi può essere necessario disporre di un numero di ricambi/ora superiori a quelli sopra indicati.
Il posizionamento verso il basso di bocchette di estrazione dell'aria può migliorare l'efficienza del sistema di ventilazione.

Il controllo della concentrazione di ossigeno all'interno della sala criobiologica deve essere eseguito mediante l'installazione di un apposito sistema di rilevamento.
Per ogni locale, il numero dei sensori non deve mai essere inferiore alle due unità a prescindere dalla volumetria del locale.

Il numero dei sensori da installare è in funzione della volumetria dei locali, come riportato nella seguente tabella:

- Fino a 50 m^3 ➔ n°2 sensori;
- Da 51 m^3 a 100 m^3 ➔ n°3 sensori;
- Da 101 m^3 a 150 m^3 ➔ n°4 sensori;
- Da 151 m^3 a 200 m^3 ➔ n°5 sensori;
- ecc.

Le soglie degli allarmi di sott'ossigenazione devono essere come qui di seguito riportato:

- Soglia 1 (preallarme di attenzione): concentrazione ossigeno < 19%;
- Soglia 2 (allarme di pericolo grave): concentrazione ossigeno < 18%.

In considerazione del fatto che l'azoto in fase liquida e i vapori freddi, tendono a stratificare verso il basso, i sensori devono essere posizionati ad un'altezza da terra compresa tra 0,70 m e 1,00 m.
I sensori non devono essere posizionati in prossimità delle bocchette di estrazione e di immissione dell'aria e in corrispondenza dei contenitori criobiologici.

Con l'attivazione dell'allarme di concentrazione ossigeno inferiore al 18%, il sistema di supervisione e di automazione deve chiudere l'elettrovalvola di ingresso dell'azoto liquido in prossimità del serbatoio criogenico fisso.
Il sistema deve essere in grado di attivare un allarme acustico-luminoso (luce lampeggiante e sirena), collocato all'interno della sala criobiologia o all'interno di altre aree dove si può verificare tale condizione, affinché gli occupanti abbandonino immediatamente il locale; l'allarme deve essere ripetuto sia esternamente al locale monitorato che in un locale costantemente presidiato (h24) dal committente.
In corrispondenza dei punti di accesso alla sala deve essere sempre osservabile il valore della concentrazione di ossigeno rilevato dai sensori posizionati all'interno della sala stessa.
All'interno della stanza è opportuno installare un pulsante di allarme, della tipologia a "FUNGO" con ritenuta, in modo che l'operatore possa segnalare una condizione di pericolo.

9.2 Controllo degli accessi

L'accesso alla sala criobiologica deve essere controllato e limitato esclusivamente al personale autorizzato. La sala criobiologica deve essere dotata di un sistema per il monitoraggio degli accessi ed è raccomandata la registrazione degli stessi.

9.3 Impianto elettrico e impianto di illuminazione

L’illuminazione naturale ed artificiale deve essere realizzata secondo i dettami del punto 1.10 dell’allegato IV del D.Lgs. 81/08 e s. m. i.; deve essere inoltre conforme alle norme tecniche applicabili.
Un interruttore esterno alla sala criobiologica deve permettere l’accensione dell’illuminazione interna al locale.
L’alimentazione delle varie apparecchiature presenti nella sala criobiologica deve essere assicurata adottando uno o più quadri elettrici generali posti all’esterno della sala stessa, dotati di un numero sufficiente di linee elettriche idonee a garantire la presenza di:

- una linea per illuminazione;
- una linea per i contenitori criobiologici e i congelatori a discesa programmata;
- una linea per altri apparecchi di potenza (impianto di video sorveglianza ed altri accessori);
- una linea per il sistema di ventilazione;
- una linea per il sistema di monitoraggio della concentrazione ossigeno.

Apparecchi o impianti elettrici critici presenti nella sala criobiologica (quali, ad esempio, i sistemi di supervisione e di automazione della sala criobiologica) dovranno essere costantemente alimentati anche in caso di interruzione dell’erogazione di energia elettrica attraverso un collegamento a gruppo elettrogeno o a gruppo statico di continuità (UPS - Uninterruptible Power Supply).

9.4 Segnaletica di sicurezza

La sala criobiologica deve essere circoscritta e delimitata da segnaletica di sicurezza, di prescrizione, di avvertimento e di divieto, come previsto dalla normativa vigente; la segnaletica deve essere posta in posizione ben visibile.
Per i dettagli vedere le “Linee guida per la sala criobiologia di un Istituto dei tessuti – Centro Nazionale Trapianti - novembre 2014”.

A titolo non esaustivo si elencano le principali indicazioni da apporre:

- Vietato l’accesso alle persone non autorizzate
- Pericolo di asfissia – atmosfera sottossigenata
- Obbligo di utilizzo dei DPI
- Abbandonare il locale in caso di allarme di sottossigenazione
- Pericolo di ustioni da freddo

9.5 Impianto di rilevazione fumi

Le recenti Linee Guida del Centro Nazionale Trapianti prevedono l’installazione di un impianto di rilevazione fumi in grado di rilevare e segnalare la presenza di un incendio all'interno della sala criobiologica. L’allarme dell’impianto rilevazione fumi deve essere remotizzato in luogo costantemente presidiato (h 24) da parte del committente.

10. Installazione e collaudo

10.1 Installazione della linea criogenica

L’installazione deve essere realizzata coerentemente con i requisiti definiti in fase di progettazione.
I rilievi delle strutture disponibili e una accurata progettazione consentono normalmente di completare in officina le seguenti attività:

- Realizzazione dei tronconi della linea criogenica;
- Messa sottovuoto dei tronconi della linea criogenica;
- Montaggio di componenti ed accessori.

Le fasi di installazione in campo comprendono:

- l’installazione dei supporti;
- l’assemblaggio dei tronconi della linea criogenica;
- il collegamento dei punti di utilizzo;
- il collegamento al serbatoio criogenico fisso.

10.2 Installazione del sistema di supervisione e di automazione

Il modulo principale del sistema e di supervisione e di automazione può essere preassemblato in officina e successivamente installato presso la sala criobiologia.

Le fasi di installazione in campo comprendono:

- il cablaggio del quadro di gestione;
- il collegamento dei sensori di linea;
- il collegamento dei sensori del serbatoio criogenico fisso;
- il collegamento delle centraline di controllo dei contenitori criobiologici;
- il collegamento agli impianti accessori (ventilazione, rilevazione fumi, controllo degli accessi, monitoraggio della sotto ossigenazione).

10.3 Collaudo

Le procedure di collaudo devono includere come minimo le seguenti prove:

In fase di fabbricazione in officina:

- Prova di tenuta e di resistenza meccanica per evidenziare eventuali perdite nella tubazione di trasferimento dell’azoto liquido
- Prova di tenuta per evidenziare eventuali perdite nell’intercapedine sotto vuoto.

In fase di installazione in campo:

- verifica della manovrabilità e dell’identificazione delle valvole;
- verifica dell’etichettatura e dei supporti della tubazione;
- verifica del collegamento al serbatoio criogenico di azoto criogenico;
- verifica della coerenza dei contenitori criobiologici ai requisiti specificati al punto 5.1.1;
- verifica del collegamento dei contenitori criobiologici all’impianto;

- verifica di funzionalità del sistema di messa a freddo;
- verifica delle prestazioni del sistema e delle logiche di funzionamento;
- prova funzionale sulle fonti di azoto liquido di back-up (se presenti);
- verifica delle prestazioni del sistema di supervisione e automazione;
- prova dei sistemi di monitoraggio e di allarme;
- verifica del rispetto dei requisiti impiantistici (corretta installazione e prestazione degli impianti elencati al punto 9).

Si ritiene opportuno che ai collaudi partecipasse anche una persona delegata dal committente e/o dall'utilizzatore finale.

11. Documentazione, consegna e messa in servizio

Tutta la documentazione fornita dal fabbricante della sala criobiologica e relativa alla progettazione dell'impianto (comprendente le specifiche, i disegni e la documentazione tecnica), dovrà essere conservata a cura del committente in un fascicolo tecnico per tutto il tempo di vita previsto per tale realizzazione.

La documentazione da fornire al committente dopo il collaudo positivo e la messa in servizio dell'impianto dovrà comprendere:

- le planimetrie, P&ID e disegni as-built dell'installazione;
- gli schemi elettrici dei sistemi di supervisione e di automazione;
- i manuali d'uso e manutenzione delle apparecchiature installate, comprensivo degli elementi necessari per la formazione per gli operatori;
- la copia di eventuali certificazioni;
- le schede di sicurezza relative all'azoto liquido;
- i verbali di collaudo;
- la dichiarazione di conformità al DM 37/08, ove applicabile;
- le relazioni di convalida, qualora richieste dal committente in fase di aggiudicazione lavori.

I documenti sopra elencati dovranno essere consegnati al committente e riportati sul verbale di consegna della sala criobiologica controfirmato per accettazione dal committente stesso.

12. Attività a cura del committente

Con riferimento agli aspetti riguardanti la sicurezza l'utilizzatore finale, congiuntamente con l'RSPP, il committente deve garantire la disponibilità di:

1) procedure e/o sistemi che consentano l'ingresso nella sala criobiologica soltanto al personale autorizzato (prevedere la tracciabilità degli accessi);
2) Un presidio costante (7 giorni/7, 24 h/24) degli allarmi relativi ai sistemi a servizio della sala criobiologica;
3) procedure per la gestione delle emergenze e delle situazioni anomale segnalate dagli allarmi.

e deve inoltre documentare:

4) la formazione continua del personale;

5) la fornitura al personale dei corretti DPI.

Ai fini della protezione da ustioni criogeniche in relazione alle diverse operazioni svolte all'interno della sala criobiologica, devono essere resi disponibili i DPI previsti dal DVR, quali ad esempio:

- visiera;
- guanti;
- grembiule;
- ghette;
- scarpe (conformi alla Norma Europea EN 20345).

In relazione al rischio di sott'ossigenazione, dovrebbero essere disponibili i seguenti DPI:

- rilevatore portatile della concentrazione di ossigeno;
- autorespiratore (da posizionare all'esterno della sala criobiologica) per consentire l'accesso in caso di emergenza.

In caso di operazioni svolte da una sola persona deve essere previsto l'impiego di un sistema "uomo a terra" in grado di rilevare eventuali malori dell'operatore.

13. Riferimenti Legislativi e Normativi

1. DIRETTIVA 93/42/CEE DEL CONSIGLIO del 14 giugno 1993 (e s.m.i.) concernente i dispositivi medici.

2. Decreto DG Sanità del 1 Aprile 2003 n. 5529 - Indirizzi funzionali e organizzativi per l'utilizzo dei tessuti, escluse le cornee, a scopo terapeutico.

3. DIRETTIVA 97/23/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 maggio 1997 per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri in materia di attrezzature a pressione.

4. DIRETTIVA 2010/35/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 giugno 2010 in materia di attrezzature a pressione trasportabili e che abroga le direttive del Consiglio 76/767/CEE, 84/525/CEE, 84/526/CEE, 84/527/CEE e 1999/36/CE.

5. EIGA IGC 115/12/E "Storage of Cryogenic Air Gases at Users' Premises

6. Linee guida per la sala criobiologia di un Istituto dei tessuti – Centro Nazionale Trapianti - novembre 2014

7. Decreto Legislativo 09 aprile 2008 n°81 e s.m.i.